

特許協力条約

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第12条、法施行規則第56条）

〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 12 JAN 2006

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 05-F-007PCT	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。		
国際出願番号 PCT/J P 2005/001987	国際出願日 (日.月.年) 03.02.2005	優先日 (日.月.年) 03.02.2004	
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00, G01N27/30, G01N27/414			
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人物質・材料研究機構			

<p>1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。</p> <p>2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>5</u> ページからなる。</p> <p>3. この報告には次の附属物件も添付されている。</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> 附属書類は全部で <u>6</u> ページである。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙（PCT規則70.16及び実施細則第607号参照）</p> <p><input type="checkbox"/> 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 電子媒体は全部で _____（電子媒体の種類、数を示す）。 配列表に関する補充欄に示すように、電子形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。 （実施細則第802号参照）</p> <p>4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 第I欄 国際予備審査報告の基礎</p> <p><input type="checkbox"/> 第II欄 優先権</p> <p><input type="checkbox"/> 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成</p> <p><input type="checkbox"/> 第IV欄 発明の単一性の欠如</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明</p> <p><input type="checkbox"/> 第VI欄 ある種の引用文献</p> <p><input type="checkbox"/> 第VII欄 国際出願の不備</p> <p><input type="checkbox"/> 第VIII欄 国際出願に対する意見</p>	
--	--

国際予備審査の請求書を受理した日 27.07.2005	国際予備審査報告を作成した日 16.12.2005		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二	4 B	3 2 2 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (2005年4月)

第 I 欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- ☒ 出願時の言語による国際出願
☐ 出願時の言語から次の目的のための言語である _____ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
☐ 国際調査 (PCT規則12.3(a)及び23.1(b))
☐ 国際公開 (PCT規則12.4(a))
☐ 国際予備審査 (PCT規則55.2(a)又は55.3(a))

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条 (PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1-14, 16-28 _____ ページ、出願時に提出されたもの

第 15, 15/1 _____ ページ*, 27.07.2005 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ ページ*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 _____ 項、出願時に提出されたもの

第 _____ 項*, PCT19条の規定に基づき補正されたもの

第 8-21 _____ 項*, 27.07.2005 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ 項*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1-13 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの

第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☒ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 1-7 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則 70.2(c))

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 8-21	有
	請求の範囲	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	有
	請求の範囲 8-21	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲 8-21	有
	請求の範囲	無

2. 文献及び説明 (PCT規則 70.7)

文献1: 宮原裕二ら, 電界効果トランジスタによるDNAのポテンシオメトリック計測, 第64回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 2003, No. 3, p. 1180

文献2: 宮原裕二ら, マイクロマシンのバイオチップ応用, 静電気学会誌, 2003, Vol. 27, p. 268-272

文献3: 坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによるDNAハイブリダイゼーションの検出, 第64回応用物理学会学術講演会講演予稿集, 2003, No. 3, p. 1179

文献4: 坂田利弥ら, 遺伝子トランジスタによるDNAのポテンシオメトリック計測, 電気学会研究会資料ケミカルセンサ研究会, 2003, CHS-03-51-55, p. 1-5

文献5: JP 2002-272463 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002. 09. 24, 全文 (ファミリーなし)

文献6: WO 2001/42498 A1 (東洋紡績株式会社) 2001. 06. 14, 全文 & EP 1241266 A1 & US 2003/0148301 A1

文献7: Zhou G. et al., Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometric assay coupled with modified primer extension reactions (BAMPER), Nucleic Acids Res., 2001, Vol. 29, E93

請求の範囲15-21に係る発明は、国際調査報告に引用された文献1-4に記載された発明に対して、進歩性を有さない。

文献1-4には、その一方の面側に核酸プローブが固定化されている絶縁膜体、前記絶縁膜体の他方の面側に当接設置されている半導体基板および参照電極が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスが記載されていると認められる。

ここで、文献1-4に記載された遺伝子検出電界効果デバイスをフローセル内部に設置すること、当該フローセルに流路を接続すること、当該フローセルに信号処理回路を接続することは当業者が適宜なし得たことである。 (補充欄に続く)

配列表に関する補充欄

第 I 欄 2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 紙形式
☒ 電子形式
- c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの
☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
☐ 出願後に、調査又は審査のために、この国際機関に提出されたもの
☐ _____ 付けて、この国際予備審査機関が補正*として受理したもの

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

*第 I 欄 4. に該当する場合、国際予備審査報告書の基礎となる配列表又は配列表に関連するテーブルに "superseded" と記入されることがある。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

そして、上記請求の範囲に係る発明とすることにより、格別な効果を奏するとは認められない。

・請求の範囲 8-14 に係る発明は、国際調査報告に引用された文献 1-7 に記載された発明に対して、進歩性を有さない。

文献 1-4 には、前記遺伝子検出電界効果デバイスを用いて、DNA は一本鎖から二本鎖を形成することにより電荷密度が変化することを利用し、特定の遺伝子多型を有する DNA と特異的にハイブリダイゼーションできるプローブ（以下、「変異型核酸プローブ」と呼ぶ。）、及び、野生型の DNA と特異的にハイブリダイゼーションできるプローブ（以下、「野生型核酸プローブ」と呼ぶ。）を、試料 DNA とハイブリダイゼーションさせて二本鎖を形成させ、それにより生じる電荷密度の変化の両者の差を測定することにより当該遺伝子多型を検出できる旨が記載されていると認められる。また、文献 2、4 には、プローブと試料 DNA の相補的な部分が多いほど、より大きな電荷密度の変化が生じる旨が記載されている。さらに、文献 5-7 に記載されているように、特定の遺伝子多型を特異的に増幅することのできるプローブを用いた伸長反応により当該遺伝子多型を有する DNA に二本鎖を形成させて増幅させ、当該遺伝子多型を検出することは本願優先日前に良く知られたことであった。

してみれば、文献 1-4 に記載された発明において、変異型核酸プローブ及び野生型核酸プローブを、試料 DNA とハイブリダイゼーションさせて二本鎖を形成させる際に、特定の遺伝子多型を特異的に増幅することのできるプローブを変異型核酸プローブとして用い、さらに伸長反応を行うことにより当該遺伝子多型を有する DNA と当該変異型核酸プローブの相補的な部分を多くし、当該遺伝子多型を効率よく検出しようとすることは当業者が容易に想到し得たことである。

その際に、変異型核酸プローブあるいは野生型核酸プローブとして、両者の非固定化端部における塩基が異なるものを用いること、及び、当該変異型核酸プローブあるいは野生型核酸プローブを固定化した遺伝子検出電界効果デバイスと、絶縁膜体上に核酸プローブが固定化されていない遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力を測定することは当業者が適宜なし得たことである。

そして、上記請求の範囲に係る発明とすることにより、格別な効果を奏するとは認められない。

(B) は目的遺伝子と核酸プローブの伸長反応が停止している状態を示している。
なお、この図5および図6における基本的な構成は、図3の例と略同様である。

図5および図6に示したとおり、この出願の発明は、上記のとりの遺伝子検
出電界効果トランジスタ(1B)を少なくとも2つ以上備えて、これら遺伝子検
5 出電界効果トランジスタ(1B)それぞれの絶縁膜体(2)上に、少なくとも2
種類の核酸プローブ(5)が固定化されてなる遺伝子検出電界効果トランジスタ
(1B)を用いることにより、SNPの解析を高感度に、また、高精度に行うこと
ができる。

上記の少なくとも2種類の核酸プローブ(5)とは、解析の対象となる目的遺
10 伝子(601)の塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型(正常型)核酸プ
ローブ(501)と、前記目的遺伝子(601)の塩基配列とは非相補的な塩基
配列を有する変異型核酸プローブ(502)を意味する(つまり、目的遺伝子の
野生型(正常型)塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型(正常型)核酸プ
ローブ(501)と、目的遺伝子の変異型塩基配列と相補的な塩基配列を有する
15 変異型核酸プローブ)。この変異型核酸プローブ(502)については、核酸プ
ローブ(5)が絶縁膜体(2)上に固定化されている端部である固定化端部(50
3)の反対側の端部、つまり、核酸プローブ(5)が固定化されていない端部で
ある非固定化端部(504)における塩基が、野生型核酸プローブ(501)の
非固定化端部(504)における塩基と相異していることが好ましい。図5(B)
20 の例では、変異型核酸プローブ(502)の非固定化端部(504)における塩
基は「G」であり、この箇所に対応する目的遺伝子の塩基は「T」となっているた
め、結合は途中で停止し、二本鎖を形成することができない。一方、野生型核酸
プローブ(501)の非固定化端部(504)における塩基は「A」であり、こ
の箇所に対応する目的遺伝子の塩基「T」とは相補的な関係にあり、結合して二
25 本鎖を形成することができる。

そして、目的遺伝子(601)の塩基配列が含まれる試料溶液(6)を上記遺
伝子検出電界効果デバイス(1A)からなる電界効果デバイス(1B)の絶縁膜
体(2)上に導入して、ハイブリダイゼーションを行わせ、未反応の目的遺伝子

(601) を緩衝溶液等で洗浄する。次いで、タック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA
ポリメラーゼ) 等の DNA 合成酵素とともに、基質となるデオキシアデ

請求の範囲

1. (削除)

2. (削除)

5 3. (削除)

4. (削除)

5. (削除)

6. (削除)

10

15

20

25

日本国特許庁 27. 7. 2005

7. (削除)

8. (補正後) その一方の面側に核酸プローブが固定化されている絶縁膜体、前記絶縁膜体の他方の面側に当接設置されている半導体基板および参照電極が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスを用いて、遺伝子多型を解析する

5 方法であって、以下のステップ:

(a) 絶縁膜体に固定化されている核酸プローブと少なくとも目的遺伝子が含まれている試料溶液とを接触させることにより、絶縁膜体上で前記核酸プローブと前記目的遺伝子とをハイブリダイズさせるステップ;

10 (b) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の前記目的遺伝子を除去するステップ;

(c) 伸長反応における酵素であるタック DNA ポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) および基質となるデオキシアデノシン三リン酸 (dATP)、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP)、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP)、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) を絶縁膜体上に導入して伸長反応を行うステップ;

15 (d) 洗浄液を絶縁膜体上に導入して、未反応の酵素および基質を除去するステップ; および

(e) 緩衝液を絶縁膜体上に導入して、野生型核酸プローブが固定化されている第1の遺伝子検出電界効果デバイスと絶縁膜体上に核酸プローブが固定化されていない第3の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 $V1$ を測定し、また、変異型核酸プローブが固定化されている第2の遺伝子検出電界効果デバイスと前記第3の遺伝子検出電界効果デバイスとの差動出力値 $V2$ を測定し、 $V1$ が $V2$ より大きいパターン ($V1 > V2$)、 $V1$ と $V2$ とが同程度であるパターン

20 ($V1 \approx V2$) および $V1$ が $V2$ より小さいパターン ($V1 < V2$) の3種類のパターンに分類して表示することで、遺伝子検出電界効果デバイスの出力値を測定するステップ;

を含むことを特徴とする遺伝子多型解析方法。

9. (補正後) 前記遺伝子検出電界効果デバイスが、少なくとも2つ以上備

えられており、かつ、これら遺伝子検出電界効果デバイスそれぞれの絶縁膜体上には目的遺伝子の野生型（正常型）塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型（正常型）核酸プローブと、目的遺伝子の変異型塩基配列と相補的な塩基配列を有する変異型核酸プローブの少なくとも2種類以上の核酸プローブが固定化されてなることを特徴とする請求項8記載の遺伝子多型解析方法。

10. （追加） 変異型核酸プローブは、核酸プローブが絶縁膜体上に固定化されていない端部である非固定化端部における塩基が、野生型核酸プローブの非固定化端部における塩基と異なっている請求項9記載の遺伝子多型解析方法。

11. （追加） 核酸プローブは、オリゴヌクレオチド、相補的 DNA (cDNA) およびペプチド核酸 (PNA) からなる群より少なくとも1種類以上が選択される請求項8から10いずれか記載の遺伝子多型解析方法。

12. （追加） 核酸プローブは、金属電極を介して固定化されている請求項8から11いずれか記載の遺伝子多型解析方法。

13. （追加） 金属電極は、白金、金、銀、パラジウム、チタンおよびクロムからなる群より少なくとも1種類以上が選択される請求項12記載の遺伝子多型解析方法。

14. （追加） ヒーターおよび温度センサが、さらに集積化されている請求項8から13いずれか記載の遺伝子多型解析方法。

15. （追加） 少なくともフローセル、流路および信号処理回路から構成されている遺伝子多型測定システムであって、

（a）フローセル内部には、その一方の面側に核酸プローブが固定化されている絶縁膜体、前記絶縁膜体の他方の面側に当接設置されている半導体基板および参照電極が備えられている遺伝子検出電界効果デバイスが設置されていること；

25 （b）前記フローセルには、前記遺伝子電界効果デバイスに試料溶液を導入するための流路が接続されていること；および

（c）前記フローセルは、遺伝子電界効果デバイスで検出した信号を処理する信号処理回路と接続されていること；

を特徴とする遺伝子多型測定システム。

16. (追加) 前記遺伝子検出電界効果デバイスが、少なくとも2つ以上備えられており、かつ、これら遺伝子検出電界効果デバイスそれぞれの絶縁膜体上には目的遺伝子の野生型(正常型)塩基配列と相補的な塩基配列を有する野生型(正常型)核酸プローブと、目的遺伝子の変異型塩基配列と相補的な塩基配列を有する変異型核酸プローブの少なくとも2種類以上の核酸プローブが固定化されてなることを特徴とする請求項15記載の遺伝子多型測定システム。

17. (追加) 変異型核酸プローブは、核酸プローブが絶縁膜体上に固定化されていない端部である非固定化端部における塩基が、野生型核酸プローブの非固定化端部における塩基と異なっている請求項16記載の遺伝子多型測定システム。

18. (追加) 核酸プローブは、オリゴヌクレオチド、相補的DNA(cDNA)およびペプチド核酸(PNA)からなる群より少なくとも1種類以上が選択される請求項15から17いずれか記載の遺伝子多型測定システム。

19. (追加) 核酸プローブは、金属電極を介して固定化されている請求項15から18いずれか記載の遺伝子多型測定システム。

20. (追加) 金属電極は、白金、金、銀、パラジウム、チタンおよびクロムからなる群より少なくとも1種類以上が選択される請求項19記載の遺伝子多型測定システム。

21. (追加) ヒーターおよび温度センサが、さらに集積化されている請求項15から20いずれか記載の遺伝子多型測定システム。